

商陆抗病毒蛋白基因在麝香百合中的转化和表达

王进忠^{1,2}, 王彦¹, 王锡锋³, 张民照¹, 高遐虹¹, 孙淑玲¹, 周广和³

(1. 北京农学院 植物科学技术系, 北京 102206; 2. 北京市农业应用新技术重点实验室, 北京 102206;

3. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100094)

摘要:以麝香百合叶片愈伤组织为受体, 利用根瘤农杆菌介导法将美洲商陆蛋白(PAP)基因和抗卡那霉素筛选基因以共转化的方式转入百合叶片愈伤组织中, 然后在含有 MS 培养基中筛选愈伤组织并得到再生植株, 在建立的农杆菌转化百合的遗传转化体系中, 获得 49 株再生植株, 经 PCR 检测表明 PAP 基因已经转移到有抗性愈伤组织再生出百合植株中。

关键词: PAP 基因; 麝香百合; 转化; 表达

中图分类号: S644.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2005)06-0077-03

Expression of Pokeweed Antiviral Protein Gene in the Callus of *Lilium longiflorum* by *Agrobacterium*-mediated Transformation

WANG Jin-zhong¹, WANG Yan-jun¹, WANG Xi-feng³, ZHANG Min-zhao¹,
GAO Xia-hong¹, SUN Shu-ling¹, ZHOU Guang-he³

(1. Department of Plant Science and Technology, Beijing Agricultural College, Beijing 102206, China;

2. Beijing Key Laboratory of New Technology in Agricultural Application, Beijing 102206, China;

3. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract: We report an efficient transformation protocol for stable introduction of PAP gene into callus of lily leaf. Calli of *Lilium longiflorum* leaf were inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 containing the binary vector PBI121-1 harboring pokeweed antiviral protein gene, which was isolated from pokeweed leaves. In the selection of antibiotics, the calli of lily were inoculated with *Agrobacterium* containing PBI121-1 produced small amount of callus on 75 mg/L kanamycin and 250 mg/L cefotaxime selection plates. Plants were regenerated from resistant calli gained from the selectable medium with MS. An optimum protocol of transformation has been established and 49 regenerative plants from transformations have been obtained. The PAP cDNA integrated into the calli of lily was assayed by PCR. The PCR analyses demonstrated stable integration of PAP gene into the *Lilium longiflorum* genomes. Expression of the genes was particularly eminent in leaf tissue of primary transformant plants. The establishment of an efficient transformation method may facilitate the improvement of lily in terms of the levels of antiviral protein.

Key words: Pokeweed antiviral protein(PAP); *Lilium longiflorum*; Transformation; Expression.

商陆抗病毒蛋白(Pokeweed antiviral protein, PAP)是一种核糖体抑制蛋白, 存在于商陆细胞壁中, 可以使异源植物不受病毒的侵染^[1]。Lodge 等把 PAP 基因导入到烟草和马铃薯中, 转基因烟草和马铃薯都表达出 PAP, 并表现出了对多种不同病毒侵染的抗性^[2]。具有广谱的抗病毒能力, 它不但对 7 个植物

病毒属的成员具有抑制作用^[3], 而且对真菌、细菌及人类免疫缺陷型病毒(HIV)等都具有一定的抑制作用^[4,5]。这种抗性无论对机械传播、对蚜虫传播的病毒都是有效的。PAP 基因转入植物体内后, 受体可以产生对多种病毒的抗性, 就可以避免目前绝大多数抗病毒转基因植物只抗单个病害而对多种病害无抗

收稿日期: 2005-08-24

基金项目: 北京市自然科学基金(5042018; 5043026)

作者简介: 王进忠(1964-), 男, 河北石家庄人, 副教授, 主要从事害虫防治与生物技术研究。

性的局面。由于以前使植物获得抗病毒特性的方法都是特异性的,因而要使植物获得对多种病毒的抗性,就必须导入多种基因,而今应用导入 PAP 基因技术的优点,就在于不必导入其他多种基因就能使植物获得广谱的抗病毒特性^[6]。在国内有将 PAP 基因导入油菜、马铃薯等作物并获得抗病毒转基因植株的报道^[7,8],然而,由于单子叶植物自身的遗传转化受到农杆菌寄主的限制,加上胚性愈伤组织不易诱导,这就为其遗传转化增加了不少难度,目前,尚未见到有关 PAP 基因成功转入球根花卉植物的报道,已报道的有 21 种病毒侵染百合,主要依靠小鳞茎进行分株繁殖,长期的营养繁殖,使得病毒积累日趋严重,造成百合生长发育不良和品种退化,而百合的抗病品种极少。在前人的基础上,本试验应用农杆菌介导法成功地将 PAP 基因导入百合愈伤组织,获得了再生植株,并对其进行了分子鉴定。笔者以麝香百合为对象,将美洲商陆抗病毒蛋白基因导入百合现代栽培品种中,为百合的品种改良开拓了新途径。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料为麝香百合(*L. longiflorum*)由北京农学院组培室和北京市农业新技术应用重点实验室提供。

1.2 菌株、质粒及其培养基

含有 PAP 基因的重组表达载体 PBI121-1 的转化农杆菌 LBA4404 由中国农科院植保所病毒组实验室提供,采用冻融法转化土壤农杆菌(*Agrobacterium Tumefaciens*),将阳性克隆的农杆菌接种于含有利福平 50 mg/mL、卡那霉素 100 mg/mL 的 YEB 培养液中,28 ℃振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.8~1.0,再用 MS 基本培养液稀释 50 倍,供试。

1.3 农杆菌感受态的转化

取重组质粒 DNA 加入感受态细胞中,轻轻混匀,冰浴 30 min,液氮冷冻 1 min,37 ℃摄氏度水浴中融化,加入 1 mL YEB 培养基,28 ℃轻摇 4 h,6000 r/min 离心 1 min,弃去 0.9 mL 上清液,用剩余的上清液重新悬浮沉淀,然后涂布于含有 100 mg/mL 利福平、50 mg/mL Kan 的 YEB 平板上,28 ℃培养 3 d,挑取长出的单菌落,在同样的含有 100 mg/mL 利福平、50 mg/mL Kan 的 YEB 培养基上化平板,28 ℃培养 3 d,挑取长出的单菌落,提取其质粒,用 PCR 的方法鉴定阳性克隆。

1.4 农杆菌转化子 PCR 检测

取 0.5 mL 的离心管加入 10× PCR buffer、dNTP (10 mmol/L)、引物 1、引物 2、DNA、Tap DNA polymerase、dd H₂O;反应条件:94 ℃预变性 3 min,然后 94 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,35 个循环,最后 72 ℃延伸 10 min,再用 0.8% 的琼脂凝胶电泳检查 PCR 扩增结果。

1.5 农杆菌液的制备

将阳性克隆的农杆菌接种于含利福平 50 mg/mL,卡那霉素 100 mg/mL 的 YEB 培养基中,28 ℃振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.8~1.0,再用 1/2 MS 培养液稀释 50 倍。

1.6 转化麝香百合

用由无菌瓶苗麝香百合增值出一批无菌瓶苗,每日光照 12 h,光照强度 2 000 lx,20 d 后更换一次培养基。头孢霉素和卡那霉素筛选浓度参照唐东芹等人的报道结果^[7]。

1.7 转化百合愈伤组织,诱导生根和无菌土壤培养

将无菌瓶苗麝香百合的叶片,接种于 MS 培养基上,28 ℃,暗培养 2 d。取出预培养的叶盘,浸泡在制备好的农杆菌中感染 20 min,期间不断振荡使得菌液与叶片充分接触,用滤纸吸干多余的菌液,接入 MS 培养基中,28 ℃下暗培养。充分取出暗培养的叶盘,接入含有卡那霉素和头孢霉素抗生素百合培养基上,每日光照 12 d,光照强度 2 000 lx。当外植体从愈伤组织中长出发芽,芽高 2~3 cm 时,将其取出切除基部的愈伤组织,转接到生根培养基上,诱导生根。壮苗后,既可将苗移栽到无菌营养土壤中,在温室中培养。

1.8 转基因麝香百合的检测

1.5 mL 离心管中分别加入 2 倍 CTAB 600 μL,加入巯基乙醇 20 μL,放入 60 ℃水浴锅中;取 0.1 g 麝香百合叶于 1.5 mL 离心管中,加液氮用台式振荡器剧烈振荡,用玻璃棒研成粉末。放入 60 ℃水浴锅中水浴 45 min,采用 CTAB 法提取叶片总 DNA,做 PCR 扩增检测。

2 结果与分析

2.1 麝香百合转化体系的建立及优化

基因转化操作过程中,为抑制细菌生长、防止污染和筛选抗生素抗性标记,常在培养基中加入一定浓度的抗生素。确定一个合适的筛选压有利于得到抗性愈伤芽和剔除非抗性芽,能有效的减少后期筛选工作,因此建立基因转化受体系统时测定植物材料对抗生素的敏感性很有必要,必须针对不同的受

体材料确定适合的筛选浓度。观察发现, 在过高的头孢霉素培养基上, 分化芽会严重的白化, 且生长缓慢, 所以, 在它的浓度能有效的抑制农杆菌的基础上, 尽量采取一个比较低的值。

2.2 麝香百合外植体的预处理对遗传转化的影响

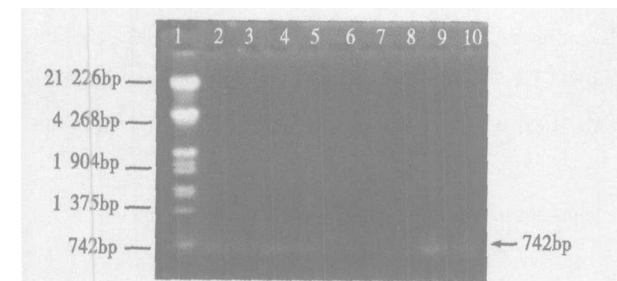
试验发现, 若在农杆菌和麝香百合叶片共培养之前, 先将叶片接种到不含任何抗生素的 MS 培养基上预培养 2 d, 再转接到含有抗生素的培养基上培养, 未经过预处理接种 300 个叶片, 经过筛选生根后得植株 36 棵, 存活率为 12.00%。而预培养接种叶片 85 片, 经筛选生根后得植株数 13 棵, 存活率为 15.29%。结果表明, 在附加抗生素的培养基上生长的叶片, 经预处理的存活率明显的高于未经处理的。

2.3 麝香百合的转化

采用叶盘法转化麝香百合, 共培养 2 d 后转到增殖培养基上, 经农杆菌侵染, 麝香百合叶片在筛选培养基上诱导分化, 10 d 后分化出抗性芽, 未经转化的外植体则逐渐变白死亡, 20 d 后一小部分分化芽已长到约 3~5 cm, 还有一部分仍处于刚分化出抗性芽阶段, 将 3~5 cm 的芽切下, 转到生根培养基上培养, 15 d 后诱导生苗。壮苗后将苗移栽到盛有无菌营养土壤中培养钵中。

2.4 PCR 检测转基因麝香百合

用 CTAB 法提取抗性筛选阳性的麝香百合叶片总 DNA 为模板, 对筛选出的 49 株麝香百合苗进行 PCR 检测, 发现其中生根植株中有 12 棵植株 PCR 产物与外源目的基因 PAP 的大小一致, 另外得 37 棵为假阳性植株。检测如图 1。



1. 分子量标准(ADNA/ EcorI + HindIII); 2~ 5, 9, 10. 转基因麝香百合; 6~ 8 阳性对照;
1. Marker(ADNA/ EcorI + HindIII); 2~ 5, 9, 10. Transgenic plant; 6~ 8. Positive control;

图 1 转基因麝香百合的 PCR 测定

Fig 1 PCR detection of transgenic plants

3 讨论

1993 年 Monsanto 公司成功地将 PAP 基因导入烟草和马铃薯, 使其转基因植株及其后代获得了广

谱的植物病毒抗性^[9], 在国内也有将 PAP 基因导入马铃薯和烟草等作物的报道^[10,11]。百合为多年生宿根植物, 常受到多种病毒的侵染, 在我国一些百合产区, 其发病率达 100%, 目前, 尚未找到有效的防治方法, 严重影响了切花百合的品质和产量, 使得百合鲜切花生产用种球 90% 以上依赖进口, 造成生产成本增加。应用植物基因工程技术, 将外源基因导入百合现代栽培品种中, 为百合的品种改良开拓了新途径。1992 年 Cohen^[12]等首次报道了利用农杆菌介导法对百合进行遗传转化。Langeveld^[2]等把几种农杆菌株接种到百合植株上, 接种后百合的茎间产生肿瘤组织, 234 标记基因得以表达。本研究采用农杆菌介导法将 PAP 基因转入麝香百合, 经过卡那霉素的筛选得到 28 株阳性植株, 经过 PCR 检测, 其中 12 颗植株的 PCR 产物与目的基因 PAP 的大小一致, 说明 PAP 基因已成功经转入到受体植株内, 为进一步利用 PAP 培育抗病毒球根花卉提供了有益借鉴。

参考文献

- [1] 张海燕, 田颖川, 周奕华, 等. 将商陆抗病毒蛋白(PAP) cDNA 导入油菜获得抗病毒转基因植株[J]. 科学通报, 1998, 43(23): 2534-2537.
- [2] Langeveld S A, Gerrits M M, Derks F L M, *et al.* Transformation of lily by *Agrobacterium* [J]. *Euphytica*, 1995, 85: 1-3; 97-100.
- [3] Chen Z C, White R F, Antoni W J F. Effects of pokeweed antiviral protein PAP on the infection of plant viruses [J]. *Plant Pathol*, 1991, 40: 612-620.
- [4] Olsom. Ribosomal inhibitory proteins inhibits HIV-1 in acutely infected peripheral blood mononuclear cells AIDS Res Hum [J]. *Retrovir*, 1991, 7: 1025-1030.
- [5] Zarling J M. Inhibition of HIV replication by pokeweed antiviral protein targeted to CD4+ cells by monoclonal antibodies [J]. *Nature*, 1990, 347: 92-95.
- [6] 张荣意, 刘志昕. 植物抗病毒基因工程的策略和机制[J]. *热带农业科学*, 2002, 22(5): 68-73.
- [7] 张海燕, 党本元, 周奕华, 等. 用微束激光穿刺技术将 PAP 导入油菜获得抗病毒转基因植株[J]. *中国激光*, 1999, 26(11): 1053-1056.
- [8] 傅道林, 王兰岚, 张海燕, 等. 用微束激光穿刺技术将商陆抗病毒蛋白(PAP) cDNA 导入马铃薯的研究[J]. *光子学报*, 2000, 29(11): 970-974.
- [9] Lodge J K, Kaniewski W K, Tumer N E. Broad spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1993, 90(15): 7089-7093.
- [10] 傅道林, 王兰岚, 张海燕, 等. 用微束激光穿刺技术将商陆抗病毒蛋白(PAP) cDNA 导入马铃薯的研究[J]. *光子学报*, 2000, 29(11): 970-974.
- [11] 黄冬芬, 邓峰, 彭世清. 美洲商陆抗病毒蛋白 cDNA 转化烟草的研究[J]. *华南热带农业大学学报*, 2004, 10(2): 13.
- [12] Cohen A, Meredith C P, Saniewski M, *et al.* *Agrobacterium* mediated transformation of *Lilium* [J]. *Acta Hort*, 1992, 325: 611-618.